Med 158

Aus der Universitäts - Frauenklinik
Hamburg - Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. G. Schubert

Das Verhalten des Diphosphopyridinnukleotides und der Adeninnukleotide in aerob glykolysierenden YAS - Zellen nach Strahleneinwirkung

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Godber Hemsen

Hamburg
1961

Aus der Universitäts - Frauenklinik
Hamburg - Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. G. Schubert

Das Verhalten des Diphosphopyridinnukleotides und der Adeninnukleotide in aerob glykolysierenden YAS - Zellen nach Strahleneinwirkung

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Godber Hemsen

Hamburg
1961

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am 8. Dez. 1961

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Dekan: Professor Dr. Malorny
Referent: Professor Dr. Schubert

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung 2
II. Methodik 5
III. Ergebnisse 9
1. Aerobe Glykolyse 9
2. DPN-Bestimmung 11
3. Bestimmung des Adeninnukleotid-gehaltes.....14
IV. Auswertung und Diskussion 17
Zusammenfassung 23
Literaturverzeichnis 25
Abbildungen 26
Lebenslauf.

I. Einleitung

Seit den grundlegenden Untersuchungen von WARBURG und seinen Mitarbeitern ist der Stoffwechsel von Tumorgewebe vielfach untersucht worden. Es wurde unter anderem festgestellt, daß im Gegensatz zur normalen Zelle, die ihren Energiebedarf aus der Atmungskettenphosphorylierung deckt, die Tumorzelle ihre Energie zu einem großen Teil aus glykolytischen Reaktionen bezieht. Ein wesentliches Kriterium bösartiger Zellen besteht darin, eine gesteigerte Glykolyse zu zeigen. Allerdings findet sich eine vermehrte Glykolyse nicht ausschließlich in malignen Geweben, sondern auch in anderen schnellwachsenden Zellverbänden (MURPHY u.a.). Dabei ist zu erwähnen, daß nach Ansicht einiger Autoren (LETTRÉ u.a.) die gesteigerte Glykolyse keine unbedingte Voraussetzung für das schnelle Wachstum der Krebszellen darstellt.

In tierischen Geweben wird bekanntlich die Glukose zu Brenztraubensäure abgebaut und über den Zitronensäurezyklus zu H_2O und CO_2 oxydiert. Wenn Sauerstoff als Wasserstoffacceptor fehlt, so tritt an dessen Stelle die Brenztraubensäure, die dann zu Milchsäure reduziert wird, das heißt, bei Sauerstoffzufuhr wird diese Milchsäurebildung kleiner oder verschwindet vollständig. Man bezeichnet diese Milchsäurebildung bei Anwesenheit von Sauerstoff als aerobe Glykolyse.

In malignen Geweben sinkt nun diese Milchsäurebildung bei Sauerstoffzutritt nicht oder nur unwesentlich ab. Es ist aber im Tumorstoffwechsel nicht nur die aerobe, sondern auch die anaerobe Glykolyse gesteigert. Der Sauerstoffverbrauch entspricht dabei dem im normalen Gewebe.

Ionisierende Strahlen hemmen, wie eine Reihe von Untersuchungen am lebenden Tiere, an Tumorschnitten und an Tumorzellen des Yoshida-Ascites-Sarkoms in

vivo zeigten, die Glykolyse und tragen dadurch zu einer Beeinträchtigung des Tumorwachstums und einer Zerstörung malignen Gewebes bei. Bisher wurden vor allem Versuche unter anaeroben Bedingungen durchgeführt, wobei die Tumoren verschiedenen Bestrahlungsdosen ausgesetzt wurden. Es wurde dabei eine Abhängigkeit der Glykolysedepression von der Strahlendosis festgestellt. Man beobachtete eine maximale Glykolyseabnahme von 50 % bei 25 000 r. Außerdem ließ sich eine Verschiebung der stationären Metabolitkonzentrationen nachweisen. Insbesondere zeigte sich ein Anstau von Fructosediphosphat (FDP) und von Dioxyacetonphosphat (DAP), sowie eine Abnahme von Brenztraubensäure (BTS). Weiterhin wurden Verschiebungen im Phosphathaushalt festgestellt in Form einer Abnahme des anorganischen Phosphates. Unter den Adeninnukleotiden fand sich eine Abnahme des Adenosintriphosphates (ATP) und eine Zunahme des Adenosindiphosphates (ADP). Schließlich ergab sich im Laufe der Untersuchungen eine Verminderung des Diphosphopyridinnukleotids (DPN) (MAASS u.a.).

In der Abnahme des DPN sehen verschiedene Autoren die Ursache für die durch Bestrahlung hervorgerufene Glykolysehemmung (SCHUBERT und Mitarb.). Andere Untersucher sind der Ansicht, daß es sich bei der strahleninduzierten Glykolysehemmung im wesentlichen um Permeabilitätsveränderungen der Zellmembranen handelt und daß die DPN-Verminderung auch eine Konsequenz dieser strahlenbedingten Strukturwandlung sein kann (DOSE und DOSE). Diese Autoren halten die durch Röntgenstrahlen verursachte Abnahme des anorganischen Phosphates für den limitierenden Faktor der Glykolysehemmung. In Versuchsreihen der angegebenen Autoren wurde nämlich durch Zusatz von anorganischem Phosphat die durch Strahlen bedingteGlykolysedepression weitgehend verhindert. Schließlich wurde auch vermutet, daß bestimmte SH-Gruppen enthaltende Fermente der Glykolysekette in ihrer Aktivität durch ionisierende Strahlen

blockiert würden. Bei entsprechenden Versuchen fand sich jedoch eine solche Blockierung nur in reinen Fermentlösungen, nicht aber in vivo (HÖHNE, KÜNKEL und MAASS).

Die genannten Untersuchungen über die Veränderungen des ADP/ATP- und des DPN-Spiegels wurden bisher systematisch nur unter anaeroben Bedingungen durchgeführt, während die Glykolyse und die stationären Zwischenstoffkonzentrationen auch unter aeroben Verhältnissen untersucht wurden. Die Konzentrationsverschiebungen dieser Zwischenstoffe verhielten sich dabei analog denen unter anaeroben Bedingungen.

In weiteren Versuchen haben wir es uns nun zur Aufgabe gemacht, das Verhalten dieser noch fehlenden strahleninduzierten Stoffwechselveränderungen in Tumorzellen unter aeroben Bedingungen zu untersuchen. Im einzelnen wurden die Glykolyse, der DPN-Spiegel und die Adeninnukleotide bei Anwesenheit von Sauerstoff gemessen.

II. Methodik

Abkürzungen: LDH = Lactat-Dehydrogenase
TPD = Triosephosphat-Dehydrogenase
PK = Pyruvatkinase
ADH = Alkohol-Dehydrogenase
AMP = Adenosinmonophosphat
PBTS= Phosphoenolbrenztraubensäure
PGS = 3-Phosphoglyzerinsäure
MK = Myokinase
PGK = Phosphoglyzeratkinase (BÜCHER-Ferment)

MDH, TPD, PK und ADH wurden bei der Firma Boehringer, Mannheim, bezogen. PGK wurde nach der Methode von BÜCHER aus Bäckerhefe gewonnen.

1. Gewinnung der Tumorzellen: Für die vorliegenden Versuche wurde das Yoshida-Ascites-Sarkom verwendet. Die Züchtung des Tumors erfolgte auf BDI-Ratten durch fortlaufende Transplantation. Die Ernährung der Tiere war eine Standardkost. Etwa 6-8 Tage nach der Inokulation der Ascites-Tumorzellen wurden die Ratten getötet und die Zellen den dekapitierten Tieren entnommen. Das Ascitesserum wurde abzentrifugiert und die zurückbleibenden Tumorzellen mehrmals mit eiskalter Bikarbonat-Ringerlösung gewaschen. Zum Abschluß zentrifugierten wir nochmals scharf und verdünnten das Zellsediment im Verhältnis 1:1 mit Bikarbonat-Ringerlösung. Auf diese Weise wurde eine Suspension beinahe reiner Tumorzellen erhalten, die höchstens 1% Leukozyten und weniger als 3% Erythrozyten enthielt. Die Vitalität dieser gewaschenen Tumorzellen wurde in mehrfachen Versuchen derart nachgeprüft, daß eine Reimplantation der gewaschenen Ascites-Sarkomzellen, wiederum auf Ratten, vorgenommen wurde. Die Angehrate der auf diese Art inokulierten Zellen war nicht kleiner als die nicht gewaschener Tumorzellen.

2. Bestrahlung: Nach wiederholtem Waschen der Tumorzellen wurden die Yoshida-Sarkomzellen, 1:1 in Ringer infundiert, bestrahlt mit Dosen von 500, 1 000, 5 000, 10 000, 15 000, 20 000 und 25 000 r

bei 200 kV, 20 mA und 2 mm Aluminiumfilterung mit einer Dosisleistung von etwa 1050 r/min. bei Zimmertemperatur unter Luft. Die Kontrollen, die keiner Bestrahlung unterlagen, waren während dieser Zeit den gleichen Bedingungen ausgesetzt.

3. Manometrische Messung des Kohlenhydratumsatzes: Die manometrischen Messungen wurden nach der üblichen von WARBURG angegebenen Methode ausgeführt. Die aerobe Glykolyse wurde in einer Ringerlösung mit einem bestimmten Bikarbonatgehalt von $3,1 \times 10^{-2}$ molar durchgeführt. Als Gasphase für die aerobe Glykolyse wurde Sauerstoff mit 5% CO_2 angewendet. Unmittelbar nach der Bestrahlung erfolgte die Inkubation von verschiedener Dauer, die in kegelförmigen sog. einarmigen Reaktionsgefässen bei 37° Celsius durchgeführt wurde. Nach dem Temperaturausgleich im Warburg-Apparat wurde die Reaktion durch Zugabe von Glukose (Endmolarität 200 mg% im Ansatz) gestartet.
   Die aerobe Glykolyse wurde rechnerisch aus dem entwickelten CO_2-Druck unter Sauerstoffsättigung bestimmt. Sämtliche Messungen wurden auf den Stickstoffgehalt bezogen (Mikrokjeldahlmethode nach KLINGMÜLLER), und zwar auf eine Zellmenge, die 100 gamma Stickstoff entsprach, da sich nach früheren Untersuchungen ergeben hatte, daß dieser Stickstoffgehalt etwa 1 mg Trockengewicht aequivalent ist.

4. DPN-Bestimmung: Die DPN-Bestimmung verlief im wesentlichen nach einer von HOLZER angegebenen Methode mit dem Unterschied, daß bei uns der Extrakt mit $HClO_4$ hergestellt wurde mit einem Puffer von $\frac{m}{2}$ Trap (Triaethanolamin-HCl-Puffer) bei p_H 8,4.
   Da die DPN-Konzentration in den Ascites-Zellen nur sehr niedrig ausfällt, wurden 0,4 ml der 1:1 verdünnten Zellaufschwemmung zur Inkubation verbraucht. Die Messung der Extinktionszunahme erfolgte nach Zusatz von kristallisierter Alkohol-Dehydrase in Gegenwart von Aethanol, Trilon und Semicarbazid in einem Gesamtvolumen von 6,0 ml, einer Schichtdicke von 40 mm. Die Reaktion kam im allgemeinen nach 15 - 17 min. zum Stehen. Von der gemessenen Extink-

tionsveränderung mußte ein Wert von 0,004, der der Extinktion der Alkoholdehydrase entspricht, abgezogen werden.

Eine weitere Versuchsreihe wurde unter Zusatz von Nikotinsäureamid (NSA) zu der Glukose durchgeführt.

5. ATP-Bestimmung: Diese Versuchsreihe wurde mit 25 000 r bestrahlt bei einer Inkubation von 20 min. Für die Analyse des ATP bedienten wir uns der Reaktion des ATP mit 3-PGS in Gegenwart von Phosphoglyzeratkinase und Magnesiumionen. Die anfallende 1,3- DiPGS wurde mit TPD und DPN-H zu PGA bei Anwesenheit eines Aldehydfängers umgesetzt. Der Ansatz war folgendermaßen:

Trilon bei p_H 7,4 (10%)	0,1ml
3-PGS m/5	0,4ml
Semicarbacidhydrochlorid molar	0,07ml
$MgSO_4$ molar	0,07ml
TPD (Boehringer)	0,04ml
PGK	0,015ml
KOH 2n	0,015ml
DPN-H (50mg/2,0ml)	0,02ml
(entsprechend einem Delta E von 1,0)	

Der Gesamtüberstand wurde mit m/2 Trap bei p_H 7,4 auf 6,0 ml aufgefüllt, in eine Cüvette, bei einer Schichtdicke von 40 mm. Der Test war mit einem Blindgang von Delta E = 0,001/min. behaftet. Daher wurde die wahre Extinktionsänderung durch Extrapolation ermittelt.

6. Bestimmung von AMP und ADP: Die Bestimmung von ADP und AMP ging in einem gemeinsamen Gefäß vor sich. Wiederum wurde mit 25 000 r bestrahlt bei einer Inkubation von 20 min. Wie bei allen übrigen Versuchen wurde auch hier gestoppt durch Hinzukippen von $HClO_4$, das denaturierte Eiweiß durch Zentrifugieren entfernt und der Überstand mit 2n KOH neutralisiert. Auch hier führten wir die enzymatische Bestimmung dieser beiden Nukleotide im optischen Test mit DPNH (366 mμ) nach Bücher durch. Zuerst wurde ADP bestimmt. Der Ansatz war folgendermaßen:

Trilon bei p_H 7,4 (10%)	0,1ml
$MgCl_2/KCL$ m/2	0,1ml
PBTS (37 mg/ml)	0,1ml
MDH	0,02ml
DPN-H (50mg/2,0ml)	0,02ml
(entsprechend einem Delta E von 1,0).	

Danach wurde mit m/2 Trap bei einem p_H von 7,4 auf ein Volumen von 6,0 ml aufgefüllt. Der Gesamtansatz wurde in 40 mm - Küvetten eingefüllt.

Nach dem Ablaufen der in der PBTS enthaltenen BTS wurde PK hinzugegeben. Die jetzt in Erscheinung tretende Extinktionsänderung ist ein Maß für das im Ansatz enthaltene ADP.

Zur Bestimmung des AMP bedienten wir uns der Myokinase-Reaktion: Bildung von AMP + ATP aus 2 ADP. Diese Reaktion verläuft in Gegenwart der Myokinase, sie ist umkehrbar. Nach Zusatz der Myokinase (0,01 ml) kam die Reaktion etwa nach 40 - 60 min. zum Stillstand. Wiederum ist die in Erscheinung tretende Extinktionsänderung des DPNH ein Maß für die Konzentration des AMP.

III. Ergebnisse

1. Aerobe Glykolyse

Die Zellen wurden verschiedenen Strahlendosen ausgesetzt und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten durch Perchlorsäure gestoppt. Abbildung 1 zeigt das Ergebnis der aeroben Glykolyse der Yoshida-Ascites-Tumorzellen bei einer Strahlendosis von 25 Kr. Die Kurve zeigt das Resultat verschiedener Versuchsreihen, bei denen die Inkubationszeiten teils 20, teils 40 min. andauerten. Die Höhe der Werte entspricht jeweils einer in 5 min. entstandenen Menge CO_2, bezogen auf eine 100 Stickstoff enthaltende Zellmenge. Die obere Kurve enthält die Kontrollwerte der in unbestrahlten Zellen abgelaufenen Glykolyse.

Nach den ersten 5 Inkubationsminuten fand sich eine Glykolysedepression von ungefähr 50%. Nach 2o min. Inkubation steigen die Werte auf ca. 60% der nicht bestrahlten Glykolyserate an und entsprechen damit erst früher gemachten Versuchs ergebnissen, die von einer aeroben Glykolysedepression von ca. 3o% bei 25 Kr sprachen. Einen auffälligen Verlauf der aeroben Glykolysekurve zeigen sowohl unbestrahlte als auch bestrahlte Versuchsergebnisse bei 25 min. Inkubation. Bei den strahleninduzierten Glykolysewerten findet sich hier nämlich eine Unterbrechung der langsam ansteigenden Kurve. Die Glykolysedepression, die schon weniger als 25% betragen hatte, fällt plötzlich wieder auf über 30% ab. Bei den Kontrollkurven, das heißt bei den unbestrahlten Yoshida-Ascites-Zellen, ist zu dieser Zeit ein entsprechender Abfall der aeroben Glykolyserate zu verzeichnen. Beiden gemeinsam ist der dann folgende Wiederanstieg. Nach 40 min. ist eine fast völlige

Erholung der Glykolysedepression festzustellen, die Werte haben sich hier bis auf ca. 90% denjenigen der Kontrollkurve angenähert.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß zwischen den Glykolysedepressionen unter aeroben Bedingungen und denjenigen unter anaeroben Bedingungen (MAASS u.a.) bei 25 Kr kein wesentlicher Unterschied besteht.

Abb.2 zeigt das Verhalten der aeroben Glykolyse nach Strahlendosen von 500, 1000, 5000, 10 000, 15 000 und 20 000 r. Wie aus der Abbildung hervorgeht, lassen sich nach 500 und 1 000 r keine Glykolysedepressionen nachweisen. Nach einer Strahlendosis von 5 Kr war die Glykolyserate nach den ersten 5 min. auf ca. 75% gesunken, nach weiteren 5 min. stieg sie auf etwa 82% der Kontrollwerte an. Nach 15 min. hatte sie beinahe die Norm erreicht. Nach 20 min. war keine Differenz mehr zu erkennen.

Nach einer Strahlendosis von 10 Kr zeigt sich nach den ersten 5 min. bereits eine Hemmung auf 61%. Nach langsam ansteigendem Verlaufe erreicht sie nach 20 min. erst ca. 85% des Kontrollwertes.

Die Kurven nach Strahlendosen von 15 und 20 Kr nähern sich in ihrem Verlauf entsprechend der ansteigenden Dosierung derjenigen nach 25 Kr. Dabei erreicht die Glykolysedepression nach 20 Kr schon fast die gleichen Werte der auf Abb.1 gezeigten Kurve.

2. DPN - Bestimmung

Das zur aeroben Glykolyse verwandte Material wurde, nachdem es mit 500, 1000, 5000, 10 000, 15 000, 20 000 und 25 000 r bestrahlt worden war, 20, 40 und 60 min. mit Glukose inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit Perchlorsäure wurde scharf zentrifugiert und der Überstand mit 2n KOH neutralisiert. In einer gesonderten Versuchsreihe wurde die DPN-Konzentration vor der Inkubation mit Glukose bestimmt.

Die hierbei gefundenen stationären DPN-Werte finden sich in Abb.3. Die Höhe der Säulen entspricht einem DPN-Spiegel von 10^{-4} μMolen, bezogen auf eine 100 γ Stickstoff enthaltende Zellmenge. Wie die Werte erkennen lassen, findet sich in den unbestrahlten Tumorzellen ein Konzentrationsgleichgewicht. In den bestrahlten Tumorzellen sinkt der DPN-Gehalt proportional mit steigender Strahlendosis ab.

Nach Strahlendosen von 500 und 1 000 r bei einer Inkubation von 20 min. lassen sich keine Veränderungen des DPN-Spiegels auffinden. Erst bei einer Bestrahlung mit 5 000 r zeigt sich eine deutliche DPN-Konzentrationsverminderung auf 82%. Die DPN-Säule nach 10 Kr bei gleicher Inkubation ist schon auf 72% der unbestrahlten Kontrollwerte gesunken. Nach einer Strahlendosis ergibt sich ein DPN-Abfall auf 58% der Kontrollmessungen. Nach 20 Kr zeigt sich eine DPN-Verminderung auf 46%, der DPN-Gehalt ist also schon auf über die Hälfte der Kontrollwerte vermindert. Bei einer weiteren Erhöhung um 5 000 r findet sich bei 0 min. Inkubation eine Depression auf 42%. Bei gleicher Dosis, aber unterschiedlicher Inkubationszeit, nämlich nach 20, 40 und 60 min., lassen sich Erhöhungen der DPN-Werte verschiedenen

Ausmasses antreffen. Nach 20 min. ergibt sich ein geringer DPN-Anstieg auf 51%, nach 40 min. steigt die DPN-Konzentration auf 54% der Kontrollwerte an. Nach 60 min. Inkubation läßt sich ein deutlicher DPN-Anstieg nachweisen, die Depression beträgt jetzt nur noch 31%.

Tabelle 1 gibt eine Anzahl von Versuchen an, in denen die DPN-Konzentrationen teils 20, teils 40 min. nach dem Start durch Glukose bestimmt wurden. Dabei wurden die nach 20 min. gefundenen Werte mit denen nach 40 min. festgestellten verglichen und die Differenz zwischen beiden ausgewertet. Im Mittel ergibt sich eine Erhöhung des DPN-Gehaltes nach 40 min. um $0{,}1 \times 10^{-4}$ µMole pro 100 µ Stickstoff gegenüber dem Spiegel bei 20 min. Das entspricht etwa einer Erhöhung von 2%. Hierdurch kann ein Unterschied zwischen verschiedenen Meßpunkten nicht gesichert werden. Somit ist ein Anstieg der DPN-Konzentration nach 40 min. gegenüber dem nach 20 min. nicht deutlich. Der scheinbare Anstieg der Säulen in Abb.3 (von 51% auf 54%) kann also als solcher kaum gewertet werden. Da sich zwischen den DPN-Depressionen nach 40 und nach 60 min. ein erheblicher Unterschied gezeigt hatte (54% gegenüber 69%), war eine entsprechende statistische Sicherung für diese Inkubationszeiten nicht erforderlich.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die DPN-Konzentrationen unter aeroben Bedingungen geringere Depressionen aufweisen als die unter anaeroben Verhältnissen (MAASS und Mitarb.).

Aus Abb.4a wird das Verhalten des DPN nach Zusatz von Jodessigsäure (JES) in einer Konzentration von $1{,}3 \times 10^{-5}$ molar erkenntlich. Dabei wurde die Konzentration so gewählt, daß eine Glykolysehemmung von 50% resultierte. Es ist, wie man erkennen kann, die DPN-Konzentration unverändert, sie verhält sich wie die unbestrahlten Kontrollwerte der anderen Versuchsreihen. Hieraus läßt sich schließen, daß die Aktivitätshemmung der TPD durch JES (HOLZER)

ohne Einfluß auf den DPN-Spiegel ist.

In Abb.4 sehen wir weiterhin die Ergebnisse einer Versuchsreihe, bei der zu den bestrahlten Zellen Nikotinsäureamid (NSA) in einer Konzentration von 1 x 10^{-4} Mole hinzugegeben wurde. Es findet sich kein Anstieg der DPN-Konzentration. Bei früheren Versuchen (MAASS u.a.) hatte sich gezeigt, daß in dem hier angewandten Nikotinsäureamid-Konzentrationsbereich ein geringer Wiederanstieg des DPN zu verzeichnen ist, was man durch eine kompetitive Hemmung der DPNasen durch NSA erklärt. Bei den hier gezeigten Untersuchungen war die NSA-Konzentration zu niedrig, als daß sie diesen Effekt hätte bewirken können (s.Abb.4b).

Tabelle 1: Stationäre DPN-Konzentrationen in Yoshida-Ascites-Sarkomzellen nach Bestrahlung mit 25 Kr, 20 und 40 min. nach Glukosezusatz.

20 min. Mol x 10^{-4} / 100 g N	40 min. Mol x 10^{-4} / 100 g N	
3,8	3,7	- 0,1
3,4	4,2	+ 0,8
4,9	5,9	+ 1,0
5,6	5,2	- 0,4
4,7	5,4	+ 0,7
4,7	4,8	+ 0,1
4,6	5,4	+ 0,8
6,3	5,3	- 1,0
6,1	5,7	- 0,4
3,9	4,8	+ 0,9

3. Bestimmung des Adeninnukleotidgehaltes

Abb.5 zeigt, daß sich bei der Einwirkung von Röntgenstrahlen auf Yoshida-Ascites-Tumorzellen eine deutliche Verschiebung der Konzentrationen der energiereichen Verbindungen unter aeroben Bedingungen erkennen läßt. Die Anzahl der zur Bestimmung der energiereichen Verbindungen durchgeführten Untersuchungen beträgt je 10, das heißt, 10 zur Bestimmung der ATP-Konzentration mit einer Strahlendosis von 25 Kr bei einer Inkubation von 20 min., dazu entsprechend 10 Kontrollen, die keiner Bestrahlung ausgesetzt waren. Außerdem wurden 10 Ansätze zur Bestimmung von AMP und ADP vorgenommen, die ebenfalls mit 25 Kr bestrahlt und einer Inkubation von 20 min. ausgesetzt wurden. Dazu wurden ebenfalls 10 entsprechende Kontrollen ohne Bestrahlung durchgeführt. Sämtliche Konzentrationen wurden im optischen Test ermittelt.

Aus Abb.5 ist erkennbar, daß ADP und AMP einen nicht unerheblichen Anstieg zu verzeichnen haben, ATP hingegen eine deutliche Depression aufweist. ADP läßt in den bestrahlten Zellen eine Zunahme seiner Konzentration um 30% erkennen. AMP zeigt eine Zunahme um ca. die vierfache Menge seines Ausgangswertes. ATP vermindert sich in seiner Konzentration um 30%. Aus früheren Arbeiten ist bekannt (MAASS u.a.), daß das anorganische Phosphat ebenfalls eine Abnahme zeigt. In diesen Versuchen ergibt sich, daß die energiereichen Phosphate unter aeroben Bedingungen sich prinzipiell nicht anders verhalten als diejenigen unter anaeroben Versuchsanordnungen. Bei den anaerob glykolysierenden Tumorzellen findet sich ein Anstau von ADP und Abnahmen von ATP und von anorganischem Phosphat.

Es wurden außerdem Versuche mit Jodessigsäure

durchgeführt (Abb.4a). Dabei war die Konzentration der JES so stark, daß eine Glykolysehemmung von 50% erfolgte. Nach HOLZER hemmt JES die Aktivität der TPD (s.oben). MAASS und RATHGEN bestimmten die Spiegel von AMP, ADP und ATP nach JES-Zusatz. Es ergab sich, daß sich die Adeninnukleotidkonzentrationen ebenso verhalten wie nach Strahlendosen von 25 Kr: ATP ist vermindert, AMP und ADP sind erhöht. ATP nimmt etwa ein Drittel seines Kontrollwertes ab. Von der Wirkung der JES kann man abschließend sagen, daß zwischen ihr und der Strahlenwirkung in Bezug auf die aerobe Glykolyse und auf die Adeninnukleotide kein Unterschied besteht. Die Adeninnukleotide verhalten sich nach Hemmung der TPD ebenso wie nach einer Strahlenschädigung, so daß man annehmen kann, daß diese Veränderungen Folge und nicht Ursache der Strahlenschädigung sind.

Aus früheren Versuchen geht hervor, daß nach einer Inkubation von 40 min. eine Erholung der Konzentrationen der energiereichen Verbindungen eintrat, das heißt, ATP nahm in seiner Konzentration wieder zu und auch die ADP-Konzentration normalisierte sich. Das anorganische Phosphat zeigte ein gesondertes, nicht sicher zu klärendes Verhalten. Sowohl die Reihe der bestrahlten, als auch die Reihe der unbestrahlten Zellen zeigten nach 40 min. ein unerklärtes Ansteigen des anorganischen Phosphates. Dieses Verhalten wurde auf das Überwiegen dephosphorylierender Vorgänge nach längerer Inkubation zurückgeführt (13).

Wenn die Jodessigsäure-Versuche und die Veränderungen der Adeninnukleotide mit der aeroben Glykolyse zusammen betrachtet werden, so fällt auf, daß nach 40 min. wieder eine regelrechte Glykolyse besteht, daß jedoch die Adeninnukleotide nach 40 min. gegenüber dem Wert nach 20 min. nur einen geringen Anstieg erkennen lassen, so daß sie noch relativ

weit von einer Normalisierung entfernt sind.

Man kann aus diesen Beobachtungen den Schluß ziehen, daß sich mit beginnender Erholung der Glykolyse auch eine zunehmende Normalisierung der Phosphatverbindungen mit Ausnahme des anorganischen Phosphates vollzieht, wenn auch eine ungleich beschleunigte Regeneration der aeroben Glykolyse vorliegt.

IV. Auswertung und Diskussion

In der ersten Versuchsreihe konnte festgestellt werden, daß die aerobe Glykolyse des Yoshida-Ascites-Sarkoms durch Röntgenstrahlen hemmbar ist. Wir fanden eine beginnende Glykolysedepression nach 5 000 r, die mit steigender Strahlendosis zunimmt, über 10 000 und 15 000 r anwächst, um bei 20 000 und 25 000 r die höchsten Ausmaße zu erreichen, das heißt, bei höchster angewandter Strahlendosis tritt die größte Depression der aeroben Glykolyserate auf. Die stärkste strahleninduzierte aerobe Glykolysehemmung betrug 50%. Weiter konnte die Beobachtung gemacht werden, daß die Glykolysehemmung reversibel ist, das heißt, daß sich nach einer bestimmten Zeit, hier 30 bis 50 min. nach Glukosezusatz, die Glykolyserate wieder den unbestrahlten Kontrollwerten nähert und zum Normbereich zurückkehrt. Diese Beobachtung bestätigt die Ergebnisse bei der anaeroben Glykolyse (MAASS u.a.). Die gleichen Untersucher fanden auch, daß bei festen Tumoren ebenfalls eine Glykolysedepression festzustellen ist, und zwar sowohl eine aerobe als auch eine anaerobe. An diesen Tumorschnitten wurde aber keine Reversibilität beobachtet, wie in so ausgeprägtem Maße auch nur an Yoshida-Ascites-Sarkom-Zellen eine reversible Glykolysedepression festgestellt werden konnte (MAASS und Mitarb.).

In dieser vorliegenden Versuchsreihe kann man die Beobachtung machen, daß der Zeitpunkt der Normalisierung der Glykolyserate abhängig ist von der Höhe der Strahlendosis. Je größer die Glykolysesenkung durch eine bestimmte Röntgendosis wird, umso später tritt die Normalisierung der Glykolysewerte in Erscheinung. Bei Dosen von 5 Kr und 10 Kr ist die Glykolyserate schon nach spätestens 20 min. auf dem Niveau der Kontrollwerte angelangt. Nach 15 und 20 Kr benötigt die Nor-

malisierung der Glykolyse erheblich länger, bis sie den Kontrollwerten angeglichen ist. Nach 25 Kr hat die Glykolysedepression 30 bis 50 min. nach dem Start durch Glukosezusatz die Kontrollwerte erreicht. Bisher hatte man angenommen, daß der Wiederanstieg der Glykolysehemmung gleichmäßig vor sich geht, wie aus verschiedenen Untersuchungen unter anaeroben Bedingungen hervorgeht. Unter aeroben Bedingungen hingegen konnte eine deutliche Unterbrechung in dem Anstieg der strahleninduzierten Glykolysehemmung beobachtet werden. Ebenso konnte die Feststellung gemacht werden, daß die Glykolyserate auch der unbestrahlten Yoshida-Ascites-Zellen plötzlich eine Unterbrechung im Sinne einer Abnahme fand. Diese Verminderung der Glykolyserate lag nach den hier vorliegenden Ergebnissen zwischen 25 und 35 min. nach dem Start durch Glukose. Für die unbestrahlten Kontrollwerte bedeutete diese akute Glykolysedepression eine Unterbrechung der konstanten CO_2-Bildung. Nach spätestens 35 min. waren von der verminderten CO_2-Bildung sowohl bei den bestrahlten Zellen als auch bei den Kontrollen keine Anzeichen dieses Geschehens mehr vorhanden. Unter anaeroben Bedingungen ergab sich keine derartige Abweichung des Wiederanstiegs der strahleninduzierten Glykolysehemmung, noch fanden sich Verminderungen der CO_2-Bildung bei den unbestrahlten Kontrollen. Eine Deutung dieser Vorgänge ist bisher nicht möglich.

In der Versuchsreihe mit Nikotinsäureamid-Zusätzen konnte keine Veränderung der strahleninduzierten Glykolysedepression beobachtet werden. Wir schlossen daraus, daß eine zu geringe Konzentration vorliegen müsse, um überhaupt eine Reaktion zeigen zu können. Aus Versuchen von MAASS und RATHGEN wissen wir nämlich, daß oberhalb einer bestimmten Konzentration an NSA die strahleninduzierte Glykolysehemmung aufgehoben wird.

Durch die NSA-bedingte kompetitive Hemmung der DPNase

steigt auch die DPN-Konzentration auf die Werte der Kontrollen an. Durch NSA scheint also eine Regeneration der Strahlenschädigung stattfinden zu können. Demnach müßte also - um die strahleninduzierten Veränderungen rückgängig zu machen - primär ein Anstieg des DPN vorliegen, dem erst sekundär in Abhängigkeit von der Zunahme des DPN-Spiegels ein Anstieg der Glykolyse folgen könnte. Hiernach würde also der Angriffspunkt der Strahlenwirkung, die zu einer Glykolysehemmung führt, in der Senkung des DPN-Spiegels liegen.

Ein wichtiges Argument gegen die Hypothese, daß die Glykolysehemmung eine Folge der strahleninduzierten DPN-Abnahme sei, ist die Beobachtung, daß die Glykolysehemmung reversibel ist, daß hingegen ein DPN-Wiederanstieg praktisch nicht gemessen werden konnte. Daher wurde bisher angenommen (MAASS u.a.), daß die Triosephosphat-Dehydrogenase normalerweise mit dem Coferment DPN gesättigt ist, so daß Konzentrationsänderungen dieses Cofermentes die Triosephosphatdehydrierung steuern, die so gering sind, daß sie mit unserer Methode nicht zu erfassen sind.

In der hier vorliegenden Versuchsreihe konnte nun aber in 10 Versuchen die Feststellung gemacht werden, daß nach einer Dosis von 25 Kr der DPN-Spiegel von einer maximalen Senkung auf 51% bzw. 54% nach 20 und 40 min. Inkubation nach weiteren 20 Inkubationsminuten immerhin auf 69% seiner unbestrahlten Kontrollen angestiegen ist. Damit wäre eine tatsächlich beginnende Erholung des DPN gezeigt, und damit wäre die Annahme gestützt, daß die Normalisierung der strahleninduzierten Glykolysehemmung, die nach spätestens 50 min. die Kontrollen erreicht, von sehr geringen bisher nicht objektiv gemessenen DPN-Zunahmen abhängig ist. Es würde damit das gewichtige Gegenargument gegen die DPN-Hypothese, nämlich das Ausbleiben der DPN-Erholung, zumindest

für die Bedingungen der aeroben Glykolyse entfallen. Auch hiernach wäre also die DPN-Verminderung die Ursache der Glykolysehemmung und der DPN-Anstieg die Basis der Glykolysenormalisierung. Auch HOLZER u.a. sprechen davon, daß der DPN-Pool unter aeroben Bedingungen leichter aufgefüllt wird als unter anaeroben.

Wie Abb.3 zeigt, ist die Höhe der Strahlendosis entscheidend für die DPN-Verminderung. Ebenso wie bei der Glykolyse ist bei Dosen von 500 und 1 000 r keine Veränderung des DPN-Spiegels zu erkennen. Erst ab 5 Kr sinken die DPN-Werte ab. Bei 25 Kr vermindert sich DPN auf 51% seiner unbestrahlten Kontrollen, nach 60 Min. ist, wie oben erwähnt, ein Wiederanstieg des DPN-Spiegels auf 69% festzustellen. Je größer also die Strahlendosis ist, umso größer ist das Absinken des DPN und damit die Glykolysedepression.

Auf welche Art allerdings die Röntgenstrahlen die Verminderung des DPN verursachen, ist bisher noch nicht geklärt. Die oben erwähnten Nikotinsäureamid-Versuche weisen auf die Bedeutung der DPNase in diesem Zusammenhang hin. Es könnte als Ursache der Strahlenschädigung eine Aktivierung der DPNase vorausgegangen sein, die durch die NSA wieder rückgängig gemacht worden ist. Man könnte in Betracht ziehen, daß eine solche Aktivierung der DPNase durch strahleninduzierte Zellpermeabilitätsveränderungen verursacht wird. Hierin wäre dann eine Synthese der verschiedenen Theorien über die Glykolysehemmung zu finden.

Untersuchungen von MAASS und RATHGEN sagen aus, daß die DPN-Verminderung über die Hemmung der Glykolyse als Ursache für die Konzentrationsänderung der energiereichen Phosphate anzusehen ist. Ein Argument gegen diese Hypothese wird von DOSE und DOSE aufrecht erhalten. Nach ihnen liegt die primäre Ursache der Glykolysehemmung im Absinken des

anorganischen Phosphates, das einen limitierenden Faktor für die Glykolyse auf der Stufe der Phosphoglyzerinaldehyd-Dehydrogenase darstellt. Der Beweis hierfür sollte aus Versuchen hervorgehen, in denen durch Inkubation der Tumorzellen in phosphatreichem Medium die Glykolysehemmung zu etwa 80% vermieden wird. Kontrolluntersuchungen von MAASS und RATHGEN machten es jedoch unwahrscheinlich, daß das anorganische Phosphat allein für die Depression der Glykolyse verantwortlich ist, es ist aber nach Ansicht dieser Untersucher für die nachfolgende Erholung der Glykolyse von Bedeutung.

Nach MEYERHOF und WILSON kommt die Depression der Glykolyse dadurch zustande, daß durch Bestrahlung die ATPase inaktiviert wird. Sie stützen ihre Theorie damit, daß sie bei ihren Untersuchungen einen Anstieg der energiereichen Phosphate, auch des ATP fanden. Eine Inaktivierung der ATPase kann aber nach unseren Ergebnissen deswegen nicht angenommen werden, weil nach der Bestrahlung ein Absinken der ATP-Konzentration um ein Drittel ihrer Kontrollwerte stattfindet, und entsprechend beim ADP und AMP ein Anstieg zu verzeichnen war. Dabei bleibt der Quotient des Myokinase-Gleichgewichtes annähernd gleich.

In der vorliegenden Versuchsreihe mit Jodessigsäure ist eine Verschiebung der Konzentrationen der Adeninnukleotide eingetreten, die sich in keiner Weise von der durch Bestrahlung hervorgerufenen Konzentrationsänderung unterscheidet. Dabei bleibt unter JES-Wirkung der DPN-Spiegel gleich. Da nach HOLZER die JES eine Hemmung der TPD bewirkt, könnte dieses Versuchsergebnis darauf hindeuten, daß der Angriffspunkt der Röntgenstrahlen ebenfalls auf der Stufe der Triosephosphatdehydrierung zu suchen ist, allerdings nicht an dem eigentlichen Ferment, sondern am Coferment,

nämlich dem DPN.

Hierin wäre also ein erneuter Hinweis dafür zu finden, daß der Angriffspunkt der Strahlenschädigung in der Veränderung des DPN-Spiegels zu suchen ist. Somit ist also aus unseren Untersuchungen über das Verhalten des DPN und der Adeninnukleotide in bestrahlten aerob glykolysierenden Yoshida-Ascites-Sarkomzellen zu schließen, daß die strahleninduzierte Hemmung der Glykolyse und die Verschiebungen der Adeninnukleotide ihre Ursache in einer Abnahme des DPN-Spiegels haben.

Zusammenfassung

Zu Beginn der Arbeit wird in einem kurzen historischen Überblick über frühere Untersuchungen berichtet, die sich mit dem Problem der Veränderung der Glykolyse, des DPN-Spiegels und der energiereichen Phosphate unter Einwirkung von Röntgenstrahlen bei anaeroben Bedingungen beschäftigen.

In eigenen Versuchsreihen wurden die gleichen Fragen unter aeroben Bedingungen untersucht.

Es wurde festgestellt, daß sich die aerobe Glykolyse von Yoshida-Ascites-Tumorzellen durch Röntgenstrahlen mit Dosen von 5, 10, 15, 20 und 25 Kr hemmen läßt, daß jedoch unterhalb von 5 Kr keine Glykolysedepression unter aeroben Bedingungen mehr nachweisbar ist. Weiterhin konnte die Beobachtung gemacht werden, daß auch unter aeroben Bedingungen eine Reversibilität der strahleninduzierten Glykolysehemmung zu verzeichnen ist, die nach 30 bis 50 min. vollständig ist.

Es wurde außerdem das Verhalten der DPN-Konzentration unter aeroben Bedingungen nach den gleichen Strahlendosen beobachtet. Dabei fand sich eine Abhängigkeit des DPN-Spiegels von der Strahlendosis, es kam nach einer Bestrahlung mit 25 Kr zu einer maximalen DPN-Verminderung auf 51% der unbestrahlten Kontrollen. Mit der Beobachtung, daß nach einer Inkubation von 60 min. der DPN-Spiegel wieder auf 69% seiner Kontrollwerte angestiegen ist, konnte hier die Reversibilität der DPN-Abnahme nachgewiesen werden, wenn zu seiner Regeneration auch eine längere Zeitspanne benötigt wird als für die Glykolyse.

In einer dritten Versuchsreihe wurden Verschiebungen der energiereichen Phosphate nach Bestrahlung

gemessen, und zwar findet sich eine Zunahme des ADP und AMP und eine Verminderung des ATP-Gehaltes.

Es ist bei den hier vorliegenden Versuchen kein prinzipieller Unterschied gegenüber den Untersuchungen unter anaeroben Bedingungen festzustellen. Die Ergebnisse sämtlicher Versuchsreihen deuten darauf hin, daß der Angriffspunkt der Strahlenschädigung der aeroben Glykolyse mit den davon abhängigen Verschiebungen der Adeninnukleotide in einer Verminderung des DPN-Spiegels zu suchen ist. Insbesondere ist die hier gefundene Reversibilität der DPN-Verminderung, die früher noch nicht gemessen werden konnte, als Hinweis hierfür zu betrachten.

Literaturverzeichnis

1. DOSE,K. u. BRESCIANI,E.: Biochem.Z. 331, S.172 (1959)
2. DOSE,K.: IX.Internat.Kongress für Radiologie, München, 1959.
3. HOLZER,H.,GOLDSCHMIDT,ST., LAMPRECHT,W. u.HELMREICH,E.: Z.Physiol.Chemie 297,1 (1954)
4. HOLZER,H. u. FRANK,S.: Ang.Chemie 70, 570 (1958)
5. HOLZER,H., HOLZER,E. u. SCHULTZ,G.: Biochem.Z.326 385 (1955)
6. HOLZER,H., HAAN,J. u. PETTE,D.: Biochem.Z. 327,195 (1955)
7. KLINGMÜLLER,V.: Z.Analyt.Chem. 131,17 (1950)
8. LETTRÉ,H.: Wiener Med.Woch. 108, 791 (1958)
9. LYNEN,F.: Liebigs Ann. 546, 120 (1941) Naturwissensch. 30, 398 (1942)
10. MAASS,H., HÖHNE,G., KÜNKEL,H.A. u. RATHGEN,G.H.: Klin.Woschr. 34, 1095 (1956)
11. MAASS,H., HÖHNE,G. u. KÜNKEL,H.A.: Strahlentherapie 35 (1955)
12. MAASS,H. u. RATHGEN,G.H.: Strahlentherapie 103 (1957)
13. MAASS,H.,HÖHNE,G. u. KÜNKEL u. RATHGEN :Z.Naturforsch. 12 b, 553 (1957)
14. MEYERHOF,O. u. WILSON,J.R.: Arch.Biochem. 23,246 (1949)
15. RACKER,E.: Fed.Proc. 16,274 (1957)
16. MAASS,H., RATHGEN,G.H., KÜNKEL,H.A. u. SCHUBERT,G.: Z.Naturforsch. 13b, 735 (1958)
17. WARBURG,O. u. CHRISTIAN,W.: Biochem.Z. 287,291 (1936)

Abbildungen

Glykolyserate unbestrahlter und mit 25 kr röntgenbestrahlter Yoshida-Ascites-Tumorzellen unter aeroben Bedingungen.

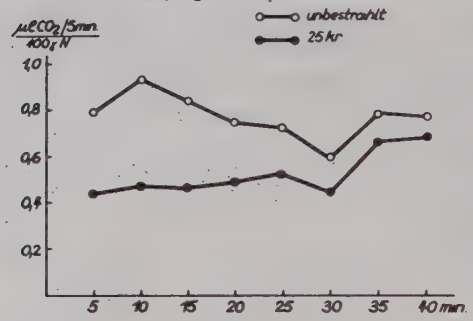

Abbildung 1

Glykolyseraten unbestrahlter und mit 5, 10, 15 u. 20 kr röntgenbestrahlter Yoshida-Ascites-Tumorzellen unter aeroben Bedingungen.

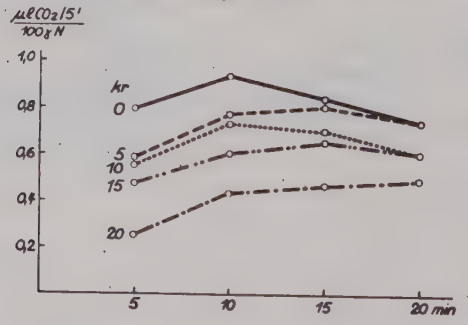

Abbildung 2

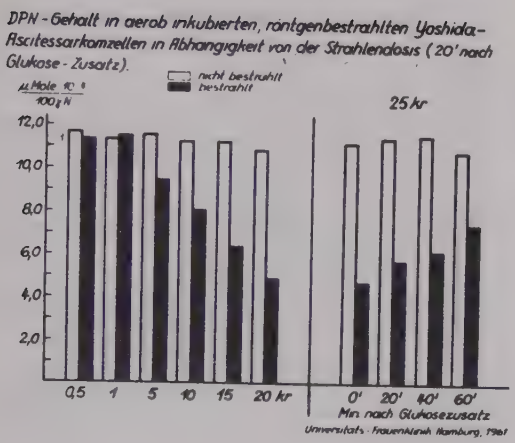

Abbildung 3

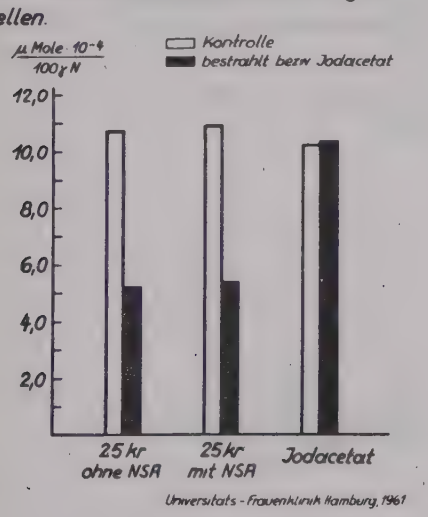

Abbildung 4a

Glykolyseraten mit und ohne Nikotinsaureamidzusatz

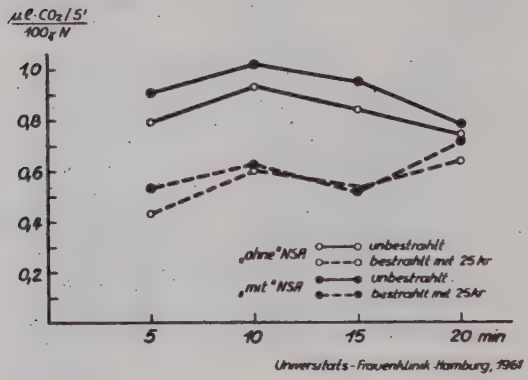

Abbildung 4b

AMP-, ADP- und ATP-Gehalt in unbestrahlten und mit 25 kr röntgenbestrahlten Yoshida-Ascitessarkomzellen, 20 min. nach Glukosezusatz.

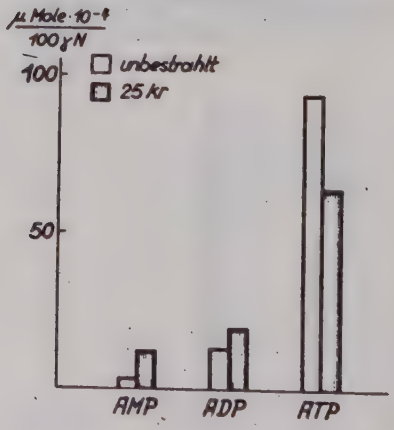

Abbildung 5

Lebenslauf

Am 12.Oktober 1932 wurde ich als Sohn des Dr.med. Friedrich Hemsen und seiner Ehefrau Emmy, geb. Lüdeke in Bargteheide/Holst. geboren.
Ich besuchte vier Jahre lang die Volksschule in Bargteheide, anschliessend die Oberschule in Ahrensburg bis zum Abitur im Jahre 1953.
Im Frühjahr 1954 begann ich das Studium der Medizin in Hamburg, wechselte später nach Kiel und bestand dort im Sommer 1956 das Physikum.
Die klinischen Semester absolvierte ich wiederum an der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf bis zum medizinischen Staatsexamen Anfang des Jahres 1960.
Meine Medizinalassistentenzeit begann ich im Vereinskrankenhaus in Kaltenkirchen/Holst. auf der Inneren Abteilung. Anschliessend arbeitete ich zwei Monate in der Kinderklinik des Allgemeinen Krankenhauses Heidberg in Hamburg.
Seit Juli 1961 bin ich in Lübeck in der Frauenklinik des Städtischen Krankenhauses Ost tätig.